



TITLE:

Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Takeda, Haruhiko

CITATION:

Takeda, Haruhiko. Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing. 京都大学, 2018, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2018-03-26

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k20989>

RIGHT:

Final publication is available at
<https://www.nature.com/articles/srep45605>

京都大学	博士（医 学）	氏 名	竹 田 治 彦
論文題目	Evolution of multi-drug resistant HCV clones from pre-existing resistant-associated variants during direct-acting antiviral therapy determined by third-generation sequencing （第三世代シーケンシングにより明らかになった、抗ウイルス薬投与下における C 型肝炎ウイルスの多剤耐性クローンの進化）		
（論文内容の要旨）			
<p>C 型肝炎ウイルス(HCV)感染症は肝癌の最大の原因の一つである。近年開発された直接作用型抗ウイルス薬(DAA)により、HCV 排除率は飛躍的に向上したが、薬剤耐性変異(RAV)を持ったウイルスクローンの出現が臨床的に大きな問題となっている。そこで、多剤耐性ウイルス出現による治療不応性の病態を明らかにするため、次世代シーケンサーによる deep sequencing 法、および、ロングリードの塩基配列決定が可能な第三世代シーケンサーを用いて、HCV の薬剤耐性変異ウイルスクローンの動態につき、検討を行った。</p> <p>京都大学医学部附属病院およびその関連施設で DAA 治療（NS5A 阻害剤+NS3 阻害剤併用療法）を受けた 283 例の HCV 陽性症例を対象とした。DAA 治療前に直接塩基決定法で NS5A 領域の代表的な RAV を検索したところ、ウイルス排除達成例(SVR)251 症例中 7.6%、ウイルス排除不成功例(non-SVR)32 症例中 56.2%で RAV が陽性であった。</p> <p>次に、non-SVR 32 例を含む計 104 例の治療前血中 HCV の NS5A, NS3 領域の RAV につき、次世代シーケンサー IonProton™ (Thermo Fisher Scientific)を用いて target-deep sequencing を行った。その結果、治療前の直接塩基決定法では NS5A 変異クローンが検出されなかった non-SVR 14 例中 10 例において、NS5A 領域の薬剤耐性ウイルス(Y93H-クローン) が治療前から潜在していることが判明した。さらに、non-SVR 症例の治療経過と薬剤耐性ウイルスの動態の詳細な解析を行ったところ、多くの症例ではウイルス再燃時に、NS3, NS5A 領域に複数の耐性変異を有する多剤耐性ウイルスが出現していることが確認された。</p> <p>そこで、Non-SVR 症例の治療後に出現した多剤耐性ウイルスが、治療前から存在していたウイルスクローン由来なのか、治療中に新たに出てきたものかを明らかにするため、第三世代シーケンサー PacBio RSII®（Pacific BioSciences）を用いて、NS3 から NS5A の連続した約 3,120bp のウイルスゲノム配列のロングリード解読を行った。第三世代シーケンサーは数万塩基の連続解読が可能である反面、塩基配列決定時のエラー率が高いとされる。そこで、本研究では、3120bp の塩基配列を 10 回以上繰り返し読むことでエラー補正を行った 10-pass Circular Consensus Sequencing (CCS) read を抽出し、解析を行った。</p> <p>まず、プラスミドコントロールの解析結果より、10-pass CCS read のエラー率は 0.03%未満と確認した。そこで、この解析プラットフォームを用いて、任意に選択した non-SVR 6 症例の治療前後ペア血清、計 12 サンプルのロングリードシーケンスを</p>			

<p>行い、各サンプルあたり平均 285 クローンの HCV 連続ゲノムを同定した。次に、各症例で治療前後での 7 か所の RAV の変化および、RAV と連鎖して存在する背景の塩基変異を解析した。その結果、再燃時の多剤耐性クローンが有している連続した複数の synonymous 変異が、治療前に潜在する一部の薬剤耐性ウイルスクローンに同様に検出されることが判明した。さらに分子系統樹解析の結果、治療前に潜伏していた特定の薬剤耐性ウイルスクローンが、DAA 治療中に複数の耐性変異を獲得し、治療終了後の多剤耐性クローンに進化していることが示唆された。</p> <p>以上の結果より、C型肝炎治療の不成功例のウイルス再燃時に検出される多剤耐性クローンは、治療前に潜在する特定の薬剤耐性変異クローンが抗ウイルス薬による選択圧を受け、新たな複数の耐性変異を獲得し、多剤耐性変異クローンへと進化することが示唆され、これが HCV に対する DAA 治療不応性の主因となっていると考えられた。</p> <p>（論文審査の結果の要旨）</p> <p>C型肝炎ウイルス(HCV)感染症に対する新規治療薬である直接作用型抗ウイルス薬により、HCV 排除率は飛躍的に向上したが、薬剤耐性変異を有するウイルスの出現が臨床的に大きな問題となっている。そこで、多剤耐性ウイルス出現による治療不応性の病態を明らかにするため、申請者らは抗 HCV 治療における薬剤耐性ウイルスクローンの動態についての検討を行った。</p> <p>次世代シーケンサーを用いた変異解析から、ウイルス排除不成功例の多くでは、薬剤耐性変異ウイルスクローンが治療前から潜在しており、再燃時には複数の耐性変異を有する多剤耐性ウイルスクローンが出現していることが明らかとなった。</p> <p>次に、ロングリード解読が可能な第三世代シーケンサーを用いて、ウイルス排除不成功例の治療前後の血中ウイルスクローンの連続塩基配列を決定し、薬剤耐性変異と連鎖した塩基配列の検証と分子系統樹解析を行ったところ、治療前に潜伏していた特定の薬剤耐性ウイルスクローンが、治療中に複数の薬剤耐性変異を獲得し、多剤耐性ウイルスクローンに進化していることが示唆された。</p> <p>以上の研究は、抗 HCV 治療における多剤耐性ウイルスの出現機序の解明に貢献し、肝癌の最大の危険因子である HCV 感染症の根絶に向けた治療戦略の発展に寄与するところが大い。</p> <p>したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。</p> <p>なお、本学位授与申請者は、平成 30 年 2 月 5 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。</p>			
要旨公開可能日：平成 年 月 日以降			